ПАРАЗИТОЛОГИЯ, VIII, 4, 1974

УДК 576.895.772

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЭКСТРАКТОВ СРЕДНЕЙ КИШКИ ЛИЧИНОК I СТАДИИ ПОДКОЖНЫХ ОВОДОВ

А. В. Третьяков и В. З. Белинская [1]

Институт онкологии МЗ СССР и Зоологический институт АН СССР,
Ленинград

Элюирование на ДЕАЕ-целлюлозе лиофилизированных экстрактов средней кишки личинок I стадии *Hypoderma bovis*, *Hypoderma lineatum* и *Oedemagena tarandi* выявило 3 активные фракции: токсическую, протеолитическую и коллагеназную. Токсический эффект наиболее сильно выражен у личинок *H. bovis*, наименьший у *O. tarandi*, в то время как протеолитическое действие экстракта у личинок *O. tarandi* сильнее, чем у *H. bovis* и *H. lineatum*. Максимум протеолитической активности у всех 3 видов лежит в градиенте pH 4.5—5.0. Коллагеназная активность у всех исследуемых видов выражена слабо. Обнаруженные различия, вероятно, отражают характер приспособительных реакций разных видов подкожных оводов для жизни в организме хозяина.

Образование свища в коже хозяина является «главной задачей» личинок I стадии подкожных оводов сем. *Hypodermatidae*. Механизм же образования свища связан с протеолитической и токсической активностью содержимого средней кишки (Оно, 1936; Lienert a. Thorsell, 1955; Beesley, 1965, 1969). В предпринятом нами ранее исследовании содержимого средней кишки личинок I стадии *Hypoderma bovis* было выделено, а затем очищено и идентифицировано протеолитическое и токсическое начало (Белинская с соавторами, 1971).

Представляет интерес выяснить различия в составе и характере действия экстрактов средней кишки личинок I стадии разных видов подкожных оводов (*H. bovis*, *H. lineatum* и *O. tarandi*) в сравнительно-физиологическом аспекте.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Личинок I стадии получали на мясокомбинатах Нарьян-Мара (*O. tarandi*), Омска (*H. bovis*) и Душанбе (*H. lineatum*) от молодняка крупного рогатого скота и оленей, транспортировали в лабораторию на льду, где тщательно выпрепаровывали среднюю кишку с содержимым и проводили лиофильную сушку. Для контроля часть экстракта *H. bovis* исследовали в сыром виде, но разницы между сырым и лиофилизированным экстрактом не обнаружили, и все полученные результаты рассчитаны и приведены по лиофилизированному материалу.

1. Определение ферментативной активности. а). Протеолитическая активность определялась по следующей схеме. Навеску лиофилизированного материала от личинок I стадии *H. bovis*, *H. lineatum* и *O. tarandi* разводили физиологическим раствором до кон-

---

[1] А. В. Третьяковым предложена и выполнена методическая часть работы, В. З. Белинской принадлежит идея постановки вопроса, сбор материала и весь паразитологический аспект работы.

центрации белка 2—3 мг/мл. Инкубационная смесь содержала в 1 мл — 200—300 мкг белка, 500 мкг нативного гемоглобина, 50 мкм глицинового HCl — буфера (PH 2.2—3.6) и 50 мкм триоацетатного буфера (pH 3.6—9.8). Реакцию проводили в течение 2 часов при 37° в термостате и останавливали 1 мл 30% ТХУ. Смесь экспонировали 30 мин. на холоду, центрифугировали при 8000 в течение 15 мин. Протеолитическую активность выражали в ед./мг белка за 120 мин. инкубации по поглощению кислоторастворимых продуктов при $\lambda_{\text{мах.}} = 280$ нм. За 1 единицу активности принимали изменение поглощения 0.05 ед. плотности раствора в кювете шириной 10 мм. В ряде случаев протеолитическую активность исследуемых экстрактов сравнивали с таковой пепсина при одинаковых условиях. б). Активность коллагеназы определяли в объеме 1 мл, содержащем 500γ коллагена в условиях, идентичных определению активности протеазы. Инкубировали 24 часа.

2. Хроматографическая очистка сырых экстрактов. 200—300 мг белка растворяли в 1.5—2.0 мл 0.015 M NaCl 0.005 M трис HCl (pH 7.4) и наносили на колонки ДЕАЕ-целлюлозы высотой 5 см и диаметром 1 см, предварительно уравновешенные и уплотненные этим же буфером в течение 24 часов при комнатной температуре. Разделение производили в условиях ступенчатой элюции растворами 0.015, 0.045, 0.095 и 0.95 M NaCl на 0.05 трис HCl буфера (pH 7.4). Каждый элюат имел объем 15 мл. Выход белка контролировали по поглощению при λ 280 нм. Полученные фракции обессоливали пропусканием через колонки молселекта G=15 (высота 8 см, диаметр 3 см), собирая восходящее плечо и максимум. В качестве растворителя применяли деионизированную воду. Элюат (10—12 мл) концентрировали сухим молселектом G=15 (фактор набухаемости — 3 мл/г сухого геля) до 2 мл. В сконцентрированных элюатах определяли протеолитическую и коллагеназную активность, а также испытывали на токсическое действие путем введения 0.1 мл элюата белым мышам внутрибрюшинно.

3. Очистка токсической фракции. Фракционирование элюата, несущего токсин, производили на колонках СМ-целлюлозы, ступенчатой элюцией (колонка высотой 8 см, диаметром 3 см, предварительно уплотнена и уравновешена раствором 0.005 M трис HCl буфера при pH 6.3). Элюировали раствором буфера: 0.005, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 и 1 M трис буфера с pH 6.3. Выход белка регистрировали так же как и в предыдущем случае. Полученные фракции (13—15 мл) обессоливали и концентрировали до 2 мл молселектом G=15 и определяли в них протеолитическую и токсическую активность. Определение молекулярного веса производили по принципу Эндрю (Andrew) на колонке сефадекса G=200. Высота колонки 60 см, диаметр 1 см, V=24 мг/час. Объем фракций — 3 мл, растворитель 0.015 M NaCl 0.05 M трис HCl (pH 7.4). Элюцию вели 0.015 M NaCl. Сбор фракций осуществляли автоматическим коллектором при комнатной температуре. Колонки калибровались пропусканием декстранового голубого (M—5000000) (для определения свободного объема) и кристаллических препаратов каталазы (M—250000), кислой фосфатазы из проростков пшеницы (M — 65000), гемоглобина (M — 48.000), рибонуклеазы (M — 14.000).

Токсическое действие белковых растворов проверяли внутрибрюшинным введением белым беспородным мышам (вес 20 г, самцы) в объеме 0.4—1 мг (содержание белка — 10 мг). Токсический эффект оценивали по времени наступления клинических признаков различного характера и смерти.

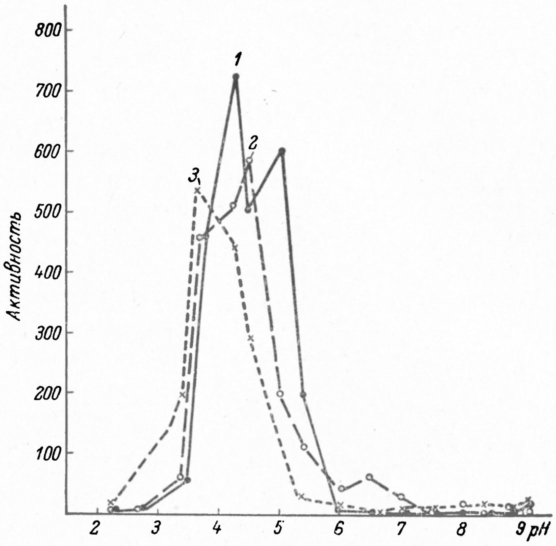
Концентрацию белка во всех случаях определяли микробиуретовым методом по Кочетову.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Элюирование в условиях ступенчатой элюции на ДЕАЕ — целлюлозе лиофилизированных экстрактов средней кишки личинок I стадии *H. bovis*, *H. lineatum* и *O. tarandi* растворами 0.015, 0.045, 0.095 и 0.95 M

NaCl выявило 3 активные фракции: токсическую, протеолитическую, коллагеназную.

Исследование протеолитической и коллагеназной активности показало, что активность ферментов выявляется в широком интервале pH для всех испытанных образцов. Из рисунка видно, что наибольшая активность протеазы отмечается в кислой зоне pH. Во всех случаях максимум отмечен в интервале 3.4—5.0 pH и превышает активность протеазы в щелочной зоне в 7—8 раз. При сравнении активности экстрактов образцов от разных видов было установлено, что наибольшей протеолитической активностью обладает в вышеуказанном интервале pH экстракт из средней кишки личинок *O. tarandi*, меньшей — *H. lineatum* и последнее место в ряду протеолитической активности занимает *H. bovis*.



Зависимость протеолитической активности неочищенных экстрактов содержимого средней кишки личинок I стадии от значений pH.

1 — *O. tarandi*; 2 — *H. lineatum*; 3 — *H. bovis*. *По оси ординат* — активность в ед. активности на мг белка за 60 мин.; *по оси абсцисс* — значение pH.

Активность коллагеназы после 24-часовой экспозиции максимальна при pH 4.5—5.0 для всех образцов и составляет 3—4 ед. активности.

Булар (Boulard, 1970), исследуя ферментативную активность вытяжек из гомогенизированных личинок *H. lineatum*, показала, что в экстракте наибольшей активностью обладает коллагеназа (при pH 7.5—8.2). В настоящее время мы не можем дать объяснение столь противоречивому результату. Причиной ли тому издержки примененной методики или то обстоятельство, что автор имел дело с неочищенной коллагеназой.

При хроматографической очистке лиофилизированных экстрактов всех трех образцов на ДЕАЕ-целлюлозе было обнаружено, что токсическая фракция практически полностью выходит при элюировании 0.015 М NaCl (буфер 0.05 трис HCl, pH 7.4), т. е. не связывается с анионитом. Определение протеолитической активности в этой фракции показало, что она все-таки существует и составляет 6—7 ед. активности.

Слабая связь токсина с анионитом привела к мысли применить дальнейшую очистку на катионите СМ-целлюлозе: фракционирование токсина на этом катионите позволило добиться высокой очистки токсина свободного от протеолитической активности. Токсины всех образцов элюировались в узком диапазоне градиента 0.5 М трис HCl-буфера. Обессоленная и сконцентрированная фракция очищенного токсина при внутрибрюшинном введении вызывала смерть подопытных мышей. Однако развитие клинических симптомов и время наступления смерти было различным при действии токсинов разных видов личинок.

Всем 24 мышам было введено по 10 мг белка токсической фракции. Мыши, инъецированные вытяжкой *H. bovis*, погибали в течение 1—3 мин. при ярко выраженной картине поражения центральной нервной системы, клинических судорог, паралича дыхательного центра, в то время как токсин от личинок *H. lineatum* и *O. tarandi* вызывал смерть животных в течение 16—25 мин. при более растянутой картине проявления симптомов.

В табл. 2 приведен процент содержания токсина по отношению к общему количеству белка до начала очистки. Из табл. 1 видно, что по

Таблица 1

Процентное содержание токсина в экстракте средней кишки по отношению к общему количеству белка

Вид	Навеска экстракта	Очищенный токсин	Выход (в %)
Hypoderma lineatum	228	48	21.4
H. bovis	225	68	30
Oedemagena tarandi	75	28	39

Таблица 2

Развитие симптомов при введении 10 мг токсической фракции экстрактов белым мышам (вес — 18—20 г)

Симптомы	*Hypoderma lineatum*	*Oedemagena tarandi*	*Hypoderma bovis*
Одышка	4′	2′	—
Атаксия	6—7′	2′	—
Угнетение	6—7	2—4′	—
Возбуждение	7′	3—4′	—
Начало судорог	7′	6′	2′
Пик судорог	8′	7′	2—3′
Паралич конечностей	12—14′	12—14′	
Смерть	19—25′	17—22′	3—5′

содержанию токсической фракции в сырых экстрактах количество токсина наивысшее у *H. bovis*. Определение М веса токсина *H. lineatum* позволило установить, что последний относится к ряду низкомолекулярных белковых веществ с молекулярным весом порядка 14.000—17.000 и свободен от примеси других белков.

Молекулярный вес протеолитической фракции 40—60000 м, коллагеназной — около 280.000. При сравнении активности протеолитической фракции из содержимого средней кишки личинок I стадии *H. lineatum* и продажного пепсина было обнаружено, что первая в 20 раз превосходила последнюю при одинаковых условиях инкубации.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наличие протеолитических ферментов в пищеварительном тракте двукрылых общеизвестно. Так, *Musca domestica* несет в себе пепсин и пепсиноподобные энзимы при оптимуме их активности при pH от 8.0—9.0 (Greenberg, 1955). Наибольший для нас интерес представляют данные по изучению пишеварительных энзимов ближайших оводам родственных двукрылых — миазных мух. Результаты исследования ферментов у *Calliphora* и *Lucilia* приведены в работах Еванса (Evans, 1958), Фрезера (Fraser, 1961), Гобсона (Hobson, 1931), Уигглсворс (Wigglesworth, 1929).

Оптимум активности протеолитических ферментов у миазных мух и их личинок лежит в щелочной зоне спектра pH (7.5—8.7). В наших опытах была обнаружена наивысшая активность в кислой зоне. Так, для личинок *O. tarandi*, *H. bovis* и *H. lineatum* максимум отмечается при pH 3.4—5.0. Энзимы, выделенные из личинок миазных мух, используются единственно для целей пищеварения. Как было уже указано выше, экстракт средней кишки личинок I стадии подкожных оводов используется для образования свища в коже хозяина и к пищеварению, вероятно, отношения не имеет. Это подтверждает определенным образом наше априорное предположение, что средняя кишка личинок I стадии подкожных оводов перестает на большем своем протяжении выполнять роль пищеварительного органа, а несет функцию резервуара, в котором накапливается «гиподермотоксин» (по терминологии Оно, 1932).

Исследование протеолитических ферментов в сравнительном плане у 3 видов личинок I стадии подкожных оводов показало, что наибольшей активностью по степени протеолиза обладает *Oedemagena tarandi*, меньшей — *H. lineatum* и последнее место в ряду занимает *H. bovis*. Забегая немного вперед, следует сказать, что активность токсической фракции при сравнении трех видов личинок обнаруживает следующую закономерность: наибольшим токсическим эффектом обладает субстрат, полученный от *H. bovis*; у *O. tarandi* и *H. lineatum* менее токсичен. Эти два результата, вероятно, следует увязать друг с другом и дать этому факту определенное, но пока гипотетическое объяснение.

Обращаясь к вопросу происхождения подкожных оводов, следует напомнить, что их разные виды заканчивают свой личиночный путь в организме хозяина под кожей, но сроки и пути, которыми личинки приходят под кожу у трех исследуемых видов различны. И эти различия отмечаются в I стадии. Основываясь на косвенных признаках, можно предположить, что *H. bovis* наиболее специализированный вид. Отсюда и различия в свойствах «гиподерматоксина» *H. bovis* и других видов подкожных оводов.

Известно (Мосолов, 1961), что кислые протеазы, атакуя субстрат, вызывают в нем необратимые изменения (денатурацию) белков и их переваривание. Успех этой операции во многом зависит от концентрации фермента. Можно предположить, что механизм действия «гиподерматоксина» таков. Вначале на субстрат действует токсическая фракция «гиподермина»; токсин блокирует систему, а затем на этом фоне вступает в действие протеолитическая фракция. Естественно, что чем сильнее токсическое действие, тем значительнее необходимые изменения в ткани, которая впоследствии станет субстратом для действия ферментов и тем меньше потребуется этого фермента для образования свища в коже хозяина.

Таким образом, различия в «гиподерматоксинах» трех исследуемых видов не есть явление случайное, а отражает определенное «приспособительное» состояние. Мы рассматриваем увеличение силы действия токсина при одновременном уменьшении активности и протеазы как приспособительный, прогрессивный признак, выделяющий в этом отношении личинок *H. bovis* как наиболее приспособленных и обеспечивает им при меньшей «затрате сил» по сравнению с *H. lineatum* и *O. tarandi* достижение цели — образование свища.

Литература

Белинская В. З., Третьяков А. В. и Янушка А. Л. 1971. О содержимом средней кишки личинок I стадии овода Hypoderma bovis De Geer. Паразитол., 5 (1) : 20—25.

Мосолов В. В. 1971. Протеолитические ферменты. М. : 1—413.

Andrews P. 1964. Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel filtration. Biochem. J., 91 : 222—223.

Beesley W. N. 1965. Recent work on the ox warble flies (Hypoderma). Veterin. Bull., 31 (1) : 1—6.

Beesley W. N. 1969. Observations on the biology of the ox warble fly (Hypoderma: Diptera, Oestridae). Ann. Tropical Med. and Parasitol., 63 (2) : 157—160.

Boulard Ch. 1970. Etude preliminaire d’une collagenase brute extaite de la larve de premier stage d’Hypoderma lineatum (de Villers). C. R. Acad. Sc. Paris, 270 : 1349—1351.

Evans W. A. 1958. Studies on the Digestive Enzymes of the Blowfly Calliphora erythrocephala. Exp. Parasit., 7 : 69—81.

Fraser A. R. 1961. Intestinal Proteinases in an Insect Calliphora vomitoriae. Nature, 192 : 999—1000.

Greenberg B. D. 1955. Proteolytic enzymes in the house fly Musca domestica. Ann. Ent. Soc. Amer., 48 : 46—50.

Hobson R. P. 1931. On an enzyme from blowfly larvae lucilia sericata, which digests Collagen in alkaline solution. Biochem. J., 25 : 1458—1462.

Linert E. a. Thorsell W. 1955. Untersuchungen über die Aktivität von Autolysate aus Wanderlarven (H. b.) auf Elemente des Bindegewebs. Expt. Parasitol., 4 : 117—122.

Ono S. 1932. Studies on hypodermatotoxin toxin obtained from the larve of Hypoderma sp. at the oesophageal stage. Journ. Jap. Soc. vet. Sci., 11 : 44.

Wigglesworth V. B. 1953. The principles of insect physiology. London, I—VIII : 332.

COMPARATIVE BIOCHEMICAL ANALYSIS OF MIDGUT EXTRACTS OF WARBLE FLIES IST STAGE LARVAE

A. V. Tretjakov and V. Z. Belinskaya

SUMMARY

Eluation of DEAE-cellulose of lyophilized midgut extracts of 1st stage larvae of *Hypoderma bovis*, *Hypoderma lineatum* and *Oedemagena tarandi* has revealed three active fractions: toxic, proteolytic and collagenase. Toxic effect is most prominent in *H. bovis* larvae and less prominent in *O. tarandi* whereas proteolytic effect of the extract of *O. tarandi* larvae is greater than that of *H. bovis* and *H. lineatum*. Maximum of proteolytic activity in all three species is in a range of pH from 4.5 to 5.0. Collagenase activity is very poor in the above species. The differences found reflect apparently the nature of adaptive reactions of hypoderma species for the life in the hosts's organism.

ИСПРАВЛЕНИЕ К ЖУРНАЛУ «ПАРАЗИТОЛОГИЯ»
ВЫП. 4, 1974 г.

В статье А. В. Третьякова и В. З. Белинской на стр. 356 в таблице 1 две последние строки следует читать:

H. bovis	75	28	39
Oedemagena tarandi	225	68	30